

学校编码: 10384

分类号\_\_密级\_\_

学 号: 20120051302124

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

抗原性相同而免疫原性差异显著的两个蛋白对T、B细胞的激活作用研究

Difference of T cell and B cell activation in two proteins with similar antigenicity but great distinct immunogenicity

伍 小 路

指导教师姓名: 罗文新 副教授

吴 婷 博士

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2008 年 6 月 30 日

论文答辩时间: 2008 年 7 月 29 日

学位授予日期: 2008 年 月 日

答辩委员会主席: 曾定 教授

评 阅 人:

2008 年 7 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 ( ), 在      年解密后适用本授权书。

2. 不保密 (    )

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名:                      日期:      年      月      日

导师签名:                      日期:      年      月      日

## 目 录

缩 略 词.....	5
摘 要.....	7
第 一 章 前 言 .....	12
一. 戊型肝炎病毒与疫苗 .....	12
1.戊型肝炎.....	12
2.戊型肝炎病毒.....	13
3.戊型肝炎病毒疫苗研究进展.....	16
4.HEV 239 与 NE2 研究进展 .....	17
二 T 细胞表位与功能.....	19
三 T 细胞表位的筛选与鉴定方法.....	25
四 抗原的类型与免疫应答 .....	34
五 本研究的目的与意义 .....	38
第 二 章 材料与方法 .....	40
一 材料 .....	40
二 方法 .....	45
第 三 章 结果与分析 .....	54
一 HEV 239 与 NE2 激活小鼠 T 细胞免疫水平 .....	54
二 HEV 239 H-2 <sup>d</sup> 限制性T表位筛选与鉴定 .....	55
三 T 细胞应答对 NE2 免疫原性的影响 .....	67
四 HEV 239 与 NE2 激活 B 细胞能力的差别 .....	71
五 HEV 239 H-2 <sup>d</sup> 限制性Th表位的应用 .....	73
第 四 章 问题与讨论 .....	75
一 HEV 239 与 NE2 蛋白免疫原性差别的原因 .....	75
二 15 肽T表位可激活抗原特异性CD8 <sup>+</sup> T细胞.....	76
三 Th 细胞的分化与可塑性 .....	78
小结与展望 .....	80

参考文献.....	81
致 谢.....	99
在学期间发表论文 .....	100

厦门大学博士论文摘要库

# Contents

<b>Abbreviation .....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>7</b>
<b>Chapter 1 Preface .....</b>	<b>12</b>
<b>I . Hepatitis E virus and vaccine development.....</b>	<b>12</b>
1.Hepatitis E.....	12
2.Hepatitis E virus.....	13
3.Progress of Hepatitis E Vaccine’s development.....	16
4.Our research of Hepatitis E Vaccine .....	17
<b>II T cell epitope and function .....</b>	<b>19</b>
<b>III Methods to identify T epitope .....</b>	<b>25</b>
<b>IV Antigen type and their immune response .....</b>	<b>34</b>
<b>V The purpose and meaning of this study .....</b>	<b>38</b>
<b>Chapter 2 Materials and Methods.....</b>	<b>40</b>
<b>I . Materials .....</b>	<b>40</b>
<b>II . Methods.....</b>	<b>45</b>
<b>Chapter 3 Results and analysis .....</b>	<b>54</b>
<b>I The ability for HEV 239 and NE2 to elicit T cell response.....</b>	<b>54</b>
<b>II Location and identification of HEV 239’s H-2<sup>d</sup> restricted T epitope .....</b>	<b>55</b>
<b>III Strong antigen specific T cell response and NE2’s immunogenicity .....</b>	<b>67</b>
<b>IV The ability for HEV 239 and NE2 to activate Naive B cell .....</b>	<b>71</b>
<b>V HEV 239 H-2<sup>d</sup> restricted Th epitope’s application .....</b>	<b>73</b>
<b>Chaper 4 Questions and discussion.....</b>	<b>75</b>
<b>I The reason why HEV 239 and NE2 have similar antigenicity but great distinct immunogenicity .....</b>	<b>75</b>
<b>II 15aa peptide can activate antigen specific CD8<sup>+</sup>T cell response.....</b>	<b>76</b>
<b>III Th cell’s differentiation and plasticity .....</b>	<b>78</b>

<b>Brief summary</b> .....	<b>80</b>
<b>References</b> .....	<b>81</b>
<b>Acknowledgement s</b> .....	<b>99</b>
<b>Appendix</b> .....	<b>100</b>

厦门大学博士论文摘要库

## 缩 略 语

**AKP:** alkaline phosphatase, 碱性磷酸酶

**APC:** Antigen presenting cell ,抗原递呈细胞

**APCs:** Antigen Presenting Cells, 抗原呈递细胞

**BCR:** B cell receptor ,B细胞受体

**Con A:** Concanavalin A, 伴刀豆蛋白A

**CTL:** Cytotoxic T Lymphocyte, 细胞毒T 淋巴细胞

**DC:** Dendritic cell,树突细胞

**ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 酶联免疫吸附分析

**ELISPOT:** Enzyme-linked immunospot assay, 酶联免疫斑点实验

**FBS:** Fetal Bovine Serum, 胎牛血清

**FCS:** Fetal Calf Serum, 小牛血清

**GM-CSF :** Granulocyte Macrophage-colony-stimulating factor,粒-巨噬细胞集落刺激因子

**HBcAg:** Hepatitis B Core Antigen, 乙型肝炎病毒核心抗原

**HBeAg:** Hepatitis B Envelope Antigen, 乙型肝炎病毒核膜抗原

**HBsAg:** Small Hepatitis B Surface Antigen, 乙型肝炎病毒表面抗原

**HBV:** Hepatitis B Virus,乙型肝炎病毒

**HE:** Hepatitis E,戊型肝炎

**HEV :** Hepatitis E Virus,戊型肝炎病毒

**HLA:** Human Leucocyte Antigen, 人白细胞抗原

**HPLC:** High performance liquid chromatography, 高效液相色谱

**HRP:** Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶

**HSP90:**Hot shock protein 90 ,热休克蛋白90

**ICAM:** Intercellular adhesion molecule ,细胞间黏附分子

**ICS:** intracellular cytokine staining, 细胞内细胞因子染色

**IFN- $\gamma$ :** Interferon  $\gamma$ ,  $\gamma$  干扰素

**IL-2:** Interleukin-2 , 白细胞介素2

**LPS:** Lipopolysaccharide ,脂多糖



**MHC: Major Histocompatible Complex**, 主要组织相容性复合物

**MID: Minimal infecting dose** 最小感染量

**NK: Natural killer**, 自然杀伤细胞

**ORF: Open Reading Frame** 开放读码框

**PCR: Polymerase Chain Reaction** , 聚合酶链反应

**PBMC: Peripheral blood mononuclear cells**, 外周血单个核细胞

**SFC: Spot forming cell**, 斑点形成细胞

**SPF: Standard Pathogen Free**, 标准无病原条件

**TAP: Transporters associated with antigen-processing**, 抗原提呈转运体

**TCR: T cell receptor**, T细胞受体

**TDag: Thymus Dependent Antigen** , 胸腺依赖抗原

**Th: Helper T lymphocyte**, 辅助T 淋巴细胞

**TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$** ,  $\alpha$  肿瘤坏死因子

**TIAg: Thymus Independent Antigen**, 非胸腺依赖抗原

**VLP: Virus Like Particle** 类病毒颗粒

## 摘要

大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒(HEV)衣壳蛋白 ORF2 的 aa394-606 片段 NE2 可以体外形成同源多聚体, 其 N 端延伸突变体 HEV 239 蛋白(ORF2 aa368-606)在体外可以自发组装成类病毒颗粒。二者具有近乎完全一致的抗原性, 但 HEV 239 的免疫原性比可溶的非颗粒蛋白 NE2 强 200 倍左右。有研究表明, 颗粒蛋白抗原比可溶性抗原能够更加有效的被抗原递呈细胞捕获从而具有更强的免疫原性, 亦有文献报道认为, 这是由于颗粒抗原能更有效的激活 B 细胞。因此对 HEV 239 与 NE2 的研究将能使我们更好的了解颗粒抗原与可溶性抗原免疫原性差别产生的原因, 并为将来合理的设计开发基因工程亚单位疫苗提供新的思路。

本文第一部分研究了 239 蛋白与 NE2 蛋白诱导机体产生 T 细胞免疫应答的能力。用铝佐剂吸附的 239 蛋白与 NE2 蛋白皮下免疫 BALB/c 小鼠, 免疫两周后取其脾细胞, 用 IL-5-ELISPOT 与 IFN- $\gamma$ -ELISPOT 方法来测定脾细胞中抗原特异性 T 细胞数量与类型。结果发现, 239 比 NE2 能激活更强的 Th1 与 Th2 应答, 这可能是 NE2 蛋白免疫原性较弱的原因之一。

本文第二部分利用覆盖 HEV 239 蛋白全长的 15AA 肽库(相邻肽段重叠 10AA)做为 IFN- $\gamma$ -ELISPOT 实验中的刺激原初步筛选 HEV 239 蛋白的 H-2<sup>d</sup>限制的 T 细胞表位。结果显示肽段 P34(序列: HSKTFFVLPLRGKLS)有较强的反应性而 P35(序列: FVLPLRGKLSFWEAG)有中等强度的反应, 其他肽段无反应。对 P34 与 P35 肽中所含 T 细胞表型的进一步研究发现肽 P34 为优势 Th 表位肽而肽 P35 包含一较弱 CTL 表位和来自 P34 肽的部分 Th 表位活性。

本文第三部分用 IFN- $\gamma$ -ELISPOT 实验来定量分析不同浓度的 239 与 NE2 蛋白体外激活 P34-CFA 免疫小鼠脾细胞的能力。结果发现, 高浓度的 239 与 NE2 都能激活 P34 特异的 T 细胞, 而在低浓度抗原的情况下, 239 仍能诱导 T 细胞应答而 NE2 不能。实验结果说明, 只有高浓度的 NE2 才能激活 T 细胞应答, 而在疫苗免疫的过程中无法实现高的局部抗原浓度, 因此 NE2 很难有效的激活 T 细胞应答。而为了验证激活 Th 细胞能力对于 NE2 蛋白免疫原性的影响, 用 P34, P35 与 P18(阴性对照) CFA 初免小鼠后再腹腔加强 5, 10, 20  $\mu$ g 铝佐剂吸附的 NE2 蛋白, 并对免疫后三周的小鼠血清中抗 HEV 抗体的进行检测, 实验结果显示 P34、P35 均对 NE2 有初免效果, 能帮助此剂量的 NE2 产生抗体应答, 但 P34 的效果比 P35

强，而 P18 无初免效果。但是 P34 初免 NE2 加强的抗体反应仍弱于低剂量 239 蛋白诱导的抗体反应。这说明不能有效激活 T 细胞是 NE2 抗原性较弱的原因，但不是唯一原因。

本研究的第四部分主要比较 NE2 与 239 蛋白活化 B 细胞能力的差异，将 0.2, 2, 20, 100  $\mu$ g 铝佐剂吸附的 HEV 239 与 NE2 蛋白腹腔免疫 Balb/C 裸鼠，每组三只，检测免疫后第 7 天与第 14 天裸鼠血清中抗 HEV 抗体。结果发现仅 0.2  $\mu$ g HEV 239 就能诱导非 T 细胞依赖的抗体应答，而 100  $\mu$ g 的 NE2 蛋白仍无法诱导可检出的非 T 细胞依赖的抗体应答。这说明活化 naive B 细胞的能力不同也有可能是 NE2 与 239 具有相同的抗原性但不同免疫性的原因之一。

最后，本文的第五部分主要将前面实验获得的 H-2<sup>d</sup>限制的 Th 表位应用于单克隆抗体的生产，对一无法利用基因工程技术表达的禽流感抗原，化学合成包含其 B 细胞表位与本研究获得的 H-2<sup>d</sup>限制的 Th 表位的肽段，将此肽段与 CFA 混合后免疫小鼠，最后我们获得了一株 B 表位特异的单克隆抗体。

总之，本研究精确定位了 HEV 239 蛋白的 H-2<sup>d</sup>限制的 Th 表位与 CTL 表位，初步的阐明造成颗粒性抗原与可溶性抗原免疫原性差别的原因，为今后疫苗的研究开发提供了新的思路。最后，利用实验中获得 Th 表位协助 B 表位获得表位特异的单克隆抗体。

关键词 戊型肝炎病毒 颗粒性抗原 疫苗 T 细胞表位 免疫原性 抗原性

## Abstract

An *E. coli* expressed recombinant antigen NE2 (HEV ORF2 aa394–606) was able to aggregate into homo-oligomer, and one of its N terminal extension mutant which was expressed in *E. coli* and named HEV 239 (HEV ORF2 aa368–606) was found to aggregate into particle. The antigenicity of HEV 239 is virtually identical to E2, which is not particulate but soluble. However, HEV 239 is over 200 times more immunogenic than NE2. Some researches found that the ability to be effectively captured by the antigen presenting cells is the reason why the particle antigen possessed great immunogenicity. But someone inclined to deem the particle antigen's strong immunogenicity as a result of its ability to activate naive B cells. The research based on why HEV 239 and NE2 possessed similar antigenicity but different immunogenicity will contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the significant high immunogenicity of particulate antigen and may provide knowledge for the rational design and development of future vaccines.

At first we compared the different ability of protein 239 and NE2 to elicit strong t cell response. BALB/c mice were immunized s.c. with 20  $\mu$ g of the HEV 239, E2, mixed with alum adjuvant, respectively. Spleen cells were harvested 2 weeks later and HEV 239-, or E2-specific T cells were enumerated by IFN- $\gamma$ -ELISPOT assay and IL-5-ELISPOT. The results showed that HEV 239 vaccination evoked much stronger antigen-specific Th1 and Th2 response than E2 vaccination, and maybe it is one of the reasons why the .NE2 possessed weaker immunogenicity.

Secondly, Forty-six overlapping 15-mer peptides that span the entire length of HEV 239 were used as stimulator of IFN- $\gamma$ -ELISPOT assay to identify T cell epitope of HEV 239. Results showed that peptide P34 (sequence: HSKTFFVLPLRGKLS) was strong reactive, peptide P35 (sequence: FVLPLRGKLSFWEAG) was moderately reactive, the other peptides were not

reactive. Further study was performed to characterize the T cell epitopes contained in peptide P34 and P35. It was found that peptide P34 contains a Th epitope when peptide 35 contains a Tc epitope .

Thirdly, different dose of NE2 and 239 was used as stimulator in IFN- $\gamma$ -ELISPOT assay to activate the spleen cells came from the 50 $\mu$ g P34 CFA immunized mouse and the P34 specific T cells were enumerated. The results showed that high concentration of 239 and NE2 were able to activate antigen specific T cell response, but when stimulated with low concentration of antigen ,protein 239 can also elicit T cell response while NE2 can not induce detectable T cell response. It suggested that only high dose NE2 not low dose can evoke T cell response. In order to verify if the disability of NE2 to elicit strong Th response has affected it's immunogenicity. Groups of five mice each were immunized s.c. with P34,P35 or a non-reactive control peptide P18. The animals were boosted 4 weeks later with 5, 10 or 20 $\mu$ g of E2. Blood samples were collected immediately before boosting and then weekly in following 3 weeks. None of the animals primed with P18 showed detectable antibody response to HEV even after high dose E2 boosting, whereas antibody responses can be induced in all of the P34-primed mice and in some of the P35-primed mice after 10 or 20  $\mu$ g E2 boosting. The priming effect of P34 is significantly better than P35, and both are significantly stronger than that of control (P18) . It is suggested that the low efficiency of T cell activation be one of the reasons for the poor intrinsic immunogenicity of NE2.

The fourth part of this paper we compared the B cell activation by HEV 239 and E2, groups of three athymic BALB/c mice each were immunized intraperitoneally with 0.2, 2, 20, 100 $\mu$ g HEV 239 or E2, mixed with alum adjuvant. Antibodies against HEV were tested on day 7 and day 14. Results showed that HEV 239 could induce T cell independent antibody production at as low as 0.2  $\mu$ g dose, whereas E2 could not induce antibody production

even when 100 $\mu$ g E2 was immunized. It suggested that the disability for NE2 to activate naive B cell may contribute to its weak immunogenicity.

At last, the H-2<sup>d</sup> restricted Th epitope acquired by former experiment was used to help a B epitope to produce its monoclonal antibody. The B epitope came from an Avian Influenza virus antigen which cannot be expressed independently. Several mice were inoculated with the peptide which contains a B cell epitope of the Avian Influenza virus antigen and the H-2<sup>d</sup> restricted Th epitope acquired by former experiments. And we acquired a monoclonal antibody from the immunized mouse.

In conclusion, we identified one H-2<sup>d</sup> restricted Th and Tc epitope in HEV 239, primarily clarified the reason why 239 and NE2 possessed similar antigenicity but different immunogenicity and provided some knowledge for the rational design and development of future vaccines. In addition, the Th epitope had been used to help a B epitope to produce its specific monoclonal antibody.

Key word: Hepatitis E Virus Particle antigen Vaccine T cell epitope  
Immunogenicity Antigenicity

## 第一章 前言

### 一 戊型肝炎病毒与疫苗研究

#### 1 戊型肝炎的流行及其危害

戊型肝炎 (Hepatitis E, HE), 在未确切定义其病原体前, 被称为急性传染性非甲非乙型肝炎 (Enterically Transmitted Non-A Non-B Hepatitis, ET-NANBH), 是一种急性地方性流行肠道疾病, 主要流行于非洲, 亚洲以及南美等卫生条件不发达发展中国家和地区, 主要由粪-口传播<sup>[1]</sup>。首次官方报道戊型肝炎始于 1955 年与 1956 年印度新德里的肝炎爆发, 发现有约 29,000 病例, 由于当时缺乏有效的血清学诊断方法, 就认为是由于甲型肝炎病毒所致, 一直到二十世纪八十年代, 在建立了对乙型肝炎以及甲型肝炎的有效血清学诊断方法, 对新德里以及克什米尔地区的血清样本进行回顾性调查发现, 患者血清内缺乏甲型/乙型肝炎病毒感染的指标, 表明有一种能引起流行性肝炎的新病原的存在<sup>[2]</sup>, 被称为非甲非乙型肝炎。

戊型肝炎 (戊肝) 多为急性发病, 一般不会发展为慢性肝炎<sup>[1]</sup>。临床症状基本上与甲型肝炎 (甲肝) 相同。病人一般有黄疸、厌食、肝肿大等症状, 少数病人出现腹部疼痛、恶心、呕吐以及发烧等症状, 表现比甲肝更剧烈一些, 死亡率也高于甲肝, 约 1%<sup>[1]</sup>。虽然孕妇感染戊肝的几率与非孕妇的没有差别<sup>[4]</sup>, 但受感染的孕妇 (尤其晚期妊娠者) 表现的病情重且死亡率高, 可达 20%, 其原因尚不清楚。80 年代以来戊型肝炎在印度及次大陆、亚洲、非洲、拉丁美洲等发展中国家流行, 我国、印度、缅甸、尼泊尔、阿富汗、巴基斯坦、印度尼西亚、泰国、黎巴嫩、前苏联中亚各国、阿尔及利亚、突尼斯、埃塞俄比亚、苏丹、索马里、乍得、象牙海岸以及中美洲的墨西哥等地均发生过暴发流行。戊肝作为一种肠道传染病在一些发展中国家可占到急性病毒性肝炎的 50%<sup>[2]</sup>。而在用水安全、卫生设施良好的欧美等发达国家仅有散发病例, 尚无大规模爆发和流行报道, 且病例多集中与外来移居者或旅行者。



图 1. 世界戊型肝炎的流行状况

Fig 1 The distribution of hepatitis E in the world

我国自1982年起即发现戊型肝炎病例，至今先后已有11次戊肝流行的报道，其中5次为水型流行，6次为食物型暴发。最大的一次暴发流行于1986年9月至1988年4月发生在新疆南部的和田、喀什和克孜勒苏三地州，波及23个县市，持续20多个月，经历了二个流行峰，共发病119280例，造成了严重危害，引起社会广泛的关注。此外，几乎在我国所有省市自治区均有散发性戊型肝炎病例发生，约占临床肝炎的15~20%。对我国13个省市、自治区的63个疾病监测点的31120名1~59岁研究对象的血清流行病学调查表明抗-HEV流行率为17.2%，反映出我国人群戊肝感染是普遍存在的。目前，越来越多的证据表明戊型肝炎是一种人畜共患病，并得到全世界的普遍关注<sup>[5]</sup>。

## 2 戊型肝炎病毒

戊肝的第一次病原学鉴定是1983年Balayan等<sup>[3]</sup>等通过对一名志愿者的研究得到的。该志愿者摄入一非甲非乙型肝炎患者的粪便污染物后出现急性肝炎症状。利用免疫电镜技术在病人的急性期粪便和康复期血清中发现一个直径约27nm(27~34nm的范围)的无包膜病毒颗粒。该病毒可成功感染食蟹猴。1990年Reyes等<sup>[7]</sup>等在成功地将ET-NANBH患者粪便悬液中的病毒样颗粒(VLPs)感染非人灵长类动物以及从胆汁来源的VLPs中克隆病毒基因组后，ET-NANBH病毒得到了最终鉴定。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库